

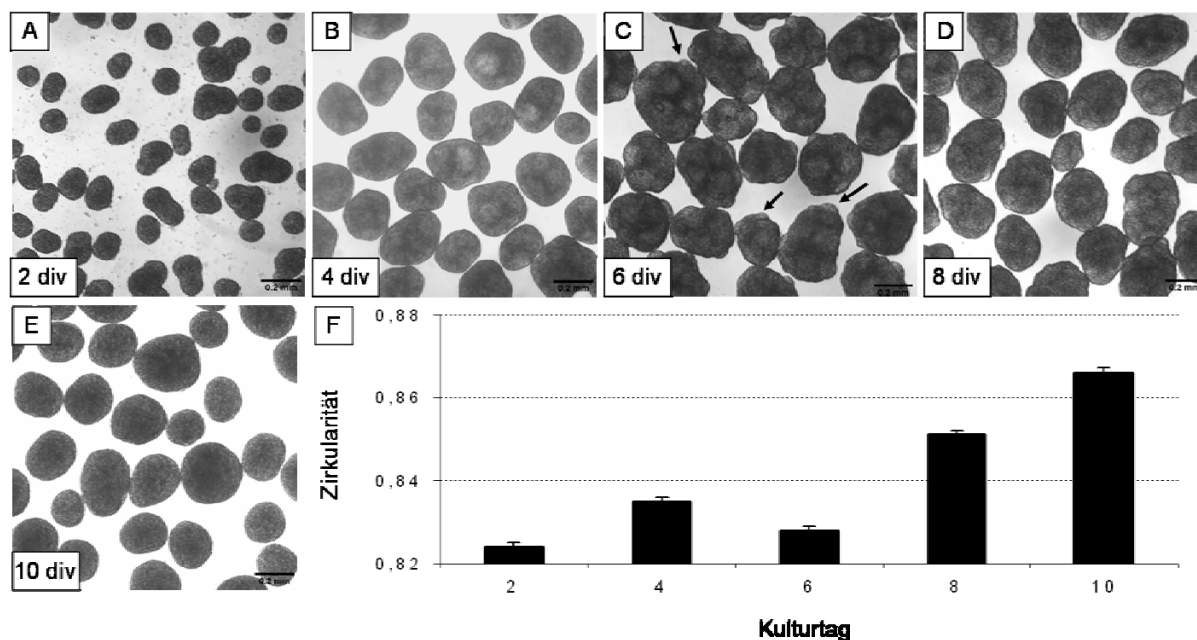
## **4.2 Zirkularität als ein neuer Wert für die Charakterisierung von Rosettensphäroiden**

### **4.2.1 Die Form von Rosettensphäroiden zeigt im Verlauf ihrer Entwicklung charakteristische Formveränderungen**

Dissoziierte Zellen embryonaler Hühnerretinae bilden bei ihrer Kultivierung auf einem Rotationsschüttler *in vitro* Reaggregate aus, die sich im Laufe ihrer Kultivierung sowohl in ihrer Größe, als auch in ihrer Form verändern. Die Vermessung der Größe von Reaggregaten nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer ist ein weit verbreiteter Standard für die Untersuchung von zellulären Reaggregaten. In dieser Arbeit wurden nun erstmals die Veränderungen in der Form von Rosettensphäroiden über den Kultivierungszeitraum hinweg, anhand ihres Zirkularitätswertes untersucht. Dieser Wert gibt eine Auskunft darüber, inwieweit die Form eines Objektes einem Kreis entspricht. Einem Kreis wird der Wert 1 zugeordnet. Je näher der Umriss eines Objektes einer Kreisform angenähert ist, desto mehr nähert sich seine Zirkularität dem Wert 1. Für diese Untersuchung wurden Sphäroide aus stets denselben Kulturschalen an den Kulturtagen zwei, vier, sechs, acht und zehn fotografiert und ihre Umrisse anschließend vermessen. Insgesamt wurden an jedem untersuchten Kulturtag jeweils 100 Sphäroide aus fünf unterschiedlichen Präparationsansätzen vermessen ( $n = 500$ ). Die gewonnenen Daten sind in Abb. 29 F graphisch dargestellt. Es zeigt sich, dass vom zweiten auf den vierten Tag in Kultur eine Zunahme des Zirkularitätswertes von 0,824 auf 0,835 verzeichnet werden kann. Der nach sechs Tagen in Kultur gemessene Wert fällt daraufhin wieder auf 0,828 ab, und steigt im weiteren Verlauf der Kultivierung kontinuierlich bis auf 0,866 nach zehn Tagen in Kultur. Anhand der, für die Auswertung angefertigten, mikroskopischen Aufnahmen lassen sich die Gründe für diesen Kurvenverlauf erkennen. Nach nur 2 Tagen in Kultur ist der Reaggregationsprozess bereits abgeschlossen. Die Sphäroide zeigen zu diesem Zeitpunkt eine weitgehend glatte Oberfläche. Allerdings finden sich bis zu diesem Zeitpunkt noch sehr viele Reaggregate in der Kultur, die aufgrund ihrer Form die Vermutung zulassen, dass zwei oder mehr Sphäroide miteinander fusioniert sind. Nach zwei weiteren Tagen in Kultur sind keine solchen Anzeichen für Fusionen mehr zu erkennen. Allerdings sind in diesem Stadium bei einigen der Reaggregate erstmals Ausbuchtungen auf der Oberfläche sichtbar, die im Lichtmikroskop heller als das Zentrum der Sphäroide erscheinen. Am sechsten Tag der Kultivie-

ung weisen fast alle Sphäroide mehrere solcher Ausbuchtungen auf (siehe Pfeile in Abb 29 C).

Innerhalb der letzten vier Tage in Kultur geht die Anzahl der Ausbuchtungen immer weiter zurück. Neben den hier geschilderten Veränderungen auf der Oberfläche der Sphäroide kommen zusätzliche Veränderungen in der Form der Sphäroide hinzu. Bis zum sechsten Tag zeigen die Sphäroide mannigfaltige Morphologien: Es können sowohl länglich-gestreckte, als auch quadratische und nicht zuletzt vorwiegend runde Sphäroide gefunden werden. Mit zunehmendem Alter nimmt die Zahl an Sphäroiden mit einer vorwiegend runden Morphologie deutlich zu, während die Zahl jener Reaggregate mit anderen Formen sich verringert. Zusammengenommen führen diese beiden Phänomene zu dem, in Abb. 29 F dargestellten rasanten Anstieg der Zirkularität in den letzten beiden Kulturtagen.

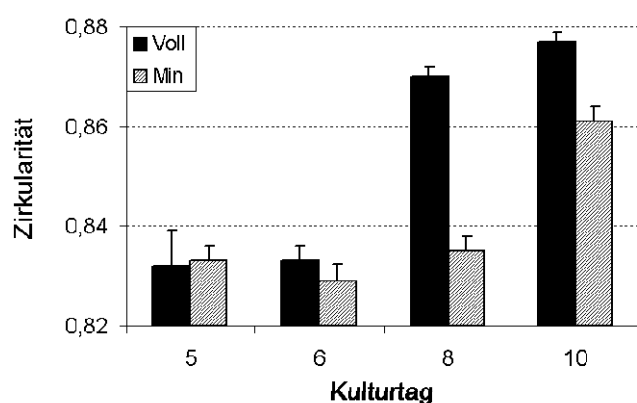


**Abbildung 29: Die Form von Sphäroiden zeigt eine charakteristische Entwicklung im Verlauf der Kultivierung.** A-E: Rosettensphäroide wurden nach 2 (A), 4 (B), 6 (C), 8 (D) und 10 DIV (E) aus stets denselben Kulturschalen entnommen, mikroskopisch fotografiert und anschließend zur weiteren Kultivierung wieder in die Kulturschalen gegeben. Pfeile markieren die am sechsten Tag auftretenden Ausbuchtungen auf den Sphäroidoberflächen. F: Vermessung der Zirkularität von Sphäroiden der entsprechenden Stadien. Die Werte aller vermessenen Sphäroide an den entsprechenden Kulturtagen wurden gemittelt und mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt (n=500). Die Bilder zeigen, dass die nach vier Tagen in Kultur noch glatte Sphäroidoberfläche sich am sechsten Kulturtag in vielen Fällen aufwölbt (Pfeile). Diese Wölbungen verschwinden im weiteren Kulturverlauf wieder, wodurch die Zirkularität der Reaggregate zunimmt. Balken = 200µm.

#### 4.2.2 Die Zirkularitätsentwicklung von Rosettensphäroiden ist abhängig vom Serumgehalt des Reaggregationsmediums

Sphäroide zeigen während ihrer Kultivierung charakteristische Veränderungen in ihrer Morphologie, die durch die Vermessung ihrer Zirkularität quantifiziert werden können. Um zu klären, inwieweit diese Entwicklung von Faktoren aus dem Reaggregationsmedium abhängig ist, wurde folgender Versuchsansatz entwickelt: die Kultivierung der Sphäroide erfolgte die ersten vier Kulturtag mit dem standardisierten, 10% FCS und 2% CS enthaltenden Reaggregationsmedium (Vollmedium). Ab dem vierten Kulturtag wurden die Sphäroide dann in Minimalmedium mit lediglich 2% FCS inkubiert. Ab dem fünften Kulturtag wurde die Zirkularität vermessen und mit den Werten von den, weiterhin mit Vollmedium kultivierten, Kontrollsphäroiden verglichen. Wie in Abb. 30 gezeigt ist, ergibt sich in diesem Fall für die Kontrollen der typische, bis zum sechsten Tag stagnierende Zirkularitätswert, auf den ein steiler Anstieg bis zum zehnten Kulturtag folgt. Sphäroide die mit Minimalmedium kultiviert werden zeigen dagegen bis zum achten Kulturtag keine signifikante Zirkularitätssteigerung. Diese setzt erst ab dem achten Tag *in vitro* ein, wobei der an Tag zehn gemessene Wert noch unterhalb des Kontrollwertes von Tag acht liegt.

Der Serumgehalt des Reaggregationsmediums hat also einen Einfluss auf die Entwicklung der Zirkularität der Sphäroide.



**Abbildung 30: Die Zirkularitätsentwicklung von Rosettensphäroiden ist abhängig vom Serumgehalt des Reaggregationsmediums.**

Vermessung der Zirkularität von Sphäroiden die nach viertägiger Kultivierung in Vollmedium weiterhin in Voll- oder Minimalmedium gehalten wurden. Die Werte aller vermessenen Sphäroide an den entsprechenden Kulturtagen wurden gemittelt und mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt (n=150).

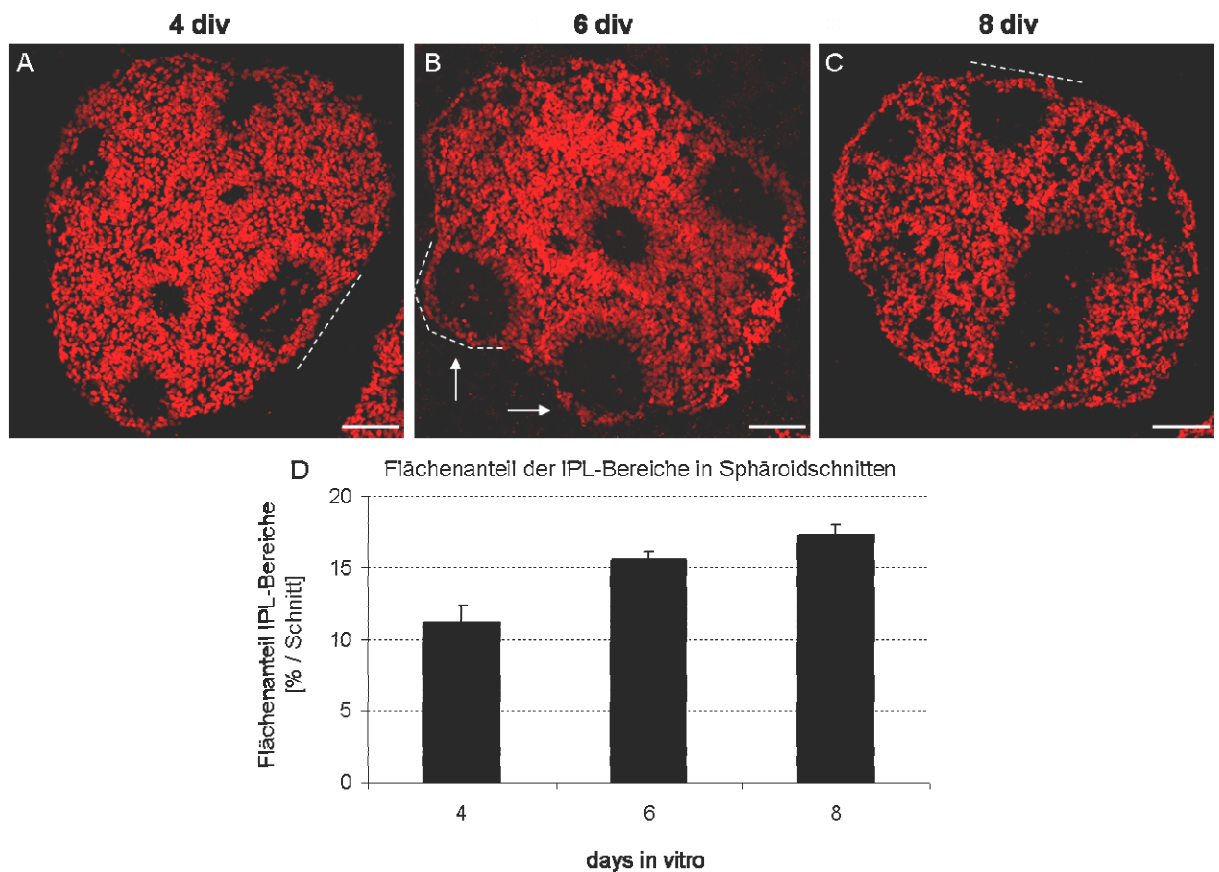
#### 4.2.3 IPL-Bereiche sind die Ursache für die charakteristische Zirkularitätsentwicklung von Rosettensphäroiden

Um das oben geschilderte Phänomen der am sechsten Kulturtag auftretenden Ausbuchtungen

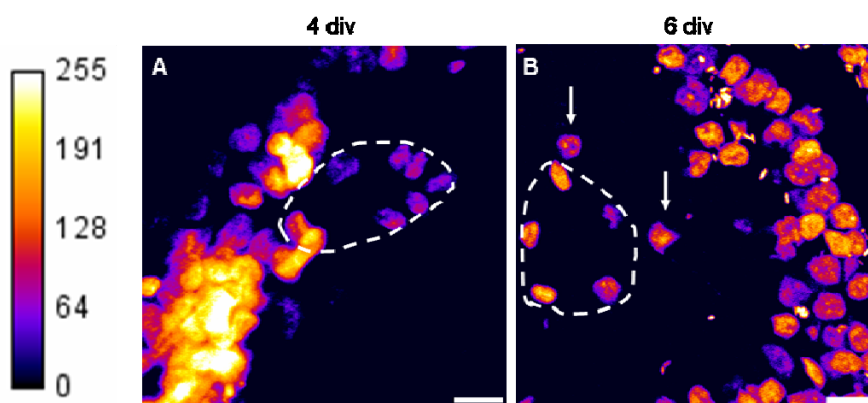
auf der Oberfläche der Reaggregate genauer zu studieren, wurden Kryostatschnitte von Sphäroiden angefertigt und anhand von Zellkernfärbungen untersucht. Die in Abb. 31 dargestellte Färbung vier Tage alter Sphäroide zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt oftmals mehrere IPL-Bereiche direkt unter der Sphäroidoberfläche zu finden sind. Die genauere Betrachtung der Zellen, die gleichzeitig die Begrenzung einer solchen IPL und die Oberfläche des Sphäroids bilden, macht deutlich, wie es im weiteren Verlauf der Kultivierung zu den Ausbuchtungen kommt. Am vierten Tag formen diese Zellen zusammen mit den restlichen, die Oberfläche in IPL-freien Bereichen bildenden, Zellen eine gerade Linie (siehe gestrichelte Linie in Abb. 31 A). Im Alter von sechs Tagen wölben sie sich dagegen, zusammen mit Teilen der IPL-Bereiche, deutlich über den Rand des Reaggregats hervor (siehe gestrichelte Linie in Abb. 31 B). Die nach vier Tagen noch gerade verlaufende Oberfläche weist nun eine Wölbung auf. Im lichtmikroskopischen Bild von wholemount-Sphäroiden zeigen sich diese Bereiche als Ausbuchtungen der Oberfläche (vgl. Abb. 29 C). Nach acht Tagen in Kultur scheinen sich die IPL-artigen Bereiche, sowie die sie an der Oberfläche begrenzenden Zellkerne in Richtung des Sphäroid-Zentrums zurückgezogen zu haben. Dadurch bilden letztere wieder eine durchgehende Linie mit jenen Oberflächenzellen, die keine IPL-artigen Bereiche begrenzen (siehe gestrichelte Linie in Abb. 31 C).

Zusätzlich wurde der Anteil, welchen die IPL-Bereiche an der gesamten Fläche der Sphäroidschnitte ausmachen, an den Kulturtagen vier, sechs und acht an jeweils 15 Schnitten aus vier verschiedenen Präparationen bestimmt ( $n=60$ ). Die in Abb. 31 D dargestellten Daten zeigen, dass dieser Anteil im Verlauf der Kultivierung kontinuierlich zunimmt.

Ein weiteres Detail, das bei der genaueren Betrachtung der IPL-Bereiche auffällt, sind die häufig auftretenden Zellkerne innerhalb der IPL-Bereiche. Die Betrachtung früher Sphäroidstadien zeigt, dass diese häufig als eine ringförmig angeordnete Gruppe aus den INL-artigen Bereichen heraustreten (vgl. Abb. 32 A) und von dort aus in das Zentrum der IPL-Bereiche hineinwandern. Dort können sie auch in späten Sphäroidstadien weiterhin nachgewiesen werden. Vereinzelt sind jedoch auch Zellen zu beobachten, die nicht innerhalb dieses Rings organisiert sind. (siehe Pfeile in Abb. 32 B).



**Abbildung 31: Die Aufwölbungen der Sphäroidoberfläche am sechsten Kulturtag werden durch IPL-Bereiche hervorgerufen. A-C:** Kernfärbungen von Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden nach 4 (A), 6 (B) und 8 DIV (C) mit SYTOX orange. **D:** Auswertung des prozentualen Flächenanteils der IPL-Bereiche an der Gesamtfläche von Sphäroidschnitten der entsprechenden Kulturstadien (n=60). Pfeile markieren die sich am sechsten Tag über die Oberfläche hinaus wölbenden IPL-Bereiche. Gestrichelte Linien markieren den Oberflächenverlauf der Sphäroide an den IPL-Bereichen. Balken = 50µm.



**Abbildung 32: Innerhalb der IPL-Bereiche kommt es zur kreisförmigen Anordnung von Zellkernen. A-B:** Kernfärbungen an Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden nach 4 (A) und 6 DIV (B) mit SYTOX orange. Für die Darstellung wurde der „Fire Lookup-Table“ von ImageJ gewählt. Links sind die den Farben entsprechenden Intensitäten der Pixel als Kalibrierungsbalken dargestellt. Gestrichelte Linien umfassen die ringförmig angeordneten Zellgruppen in den IPL-Bereichen. Pfeile markieren Zellen, die sich nicht innerhalb der Zellgruppe befinden. Die Färbungen zeigen, dass sich im Laufe der Kultivierung ringförmig angeordnete Zellgruppen ausbilden.

den INL-artigen Bereichen lösen. Später finden sich ringförmig angeordneten Zellen innerhalb der IPL-Bereiche. Es sind jedoch auch Zellen zu finden, die nicht in diesem Zellring organisiert sind (Pfeile). Balken = 15µm.

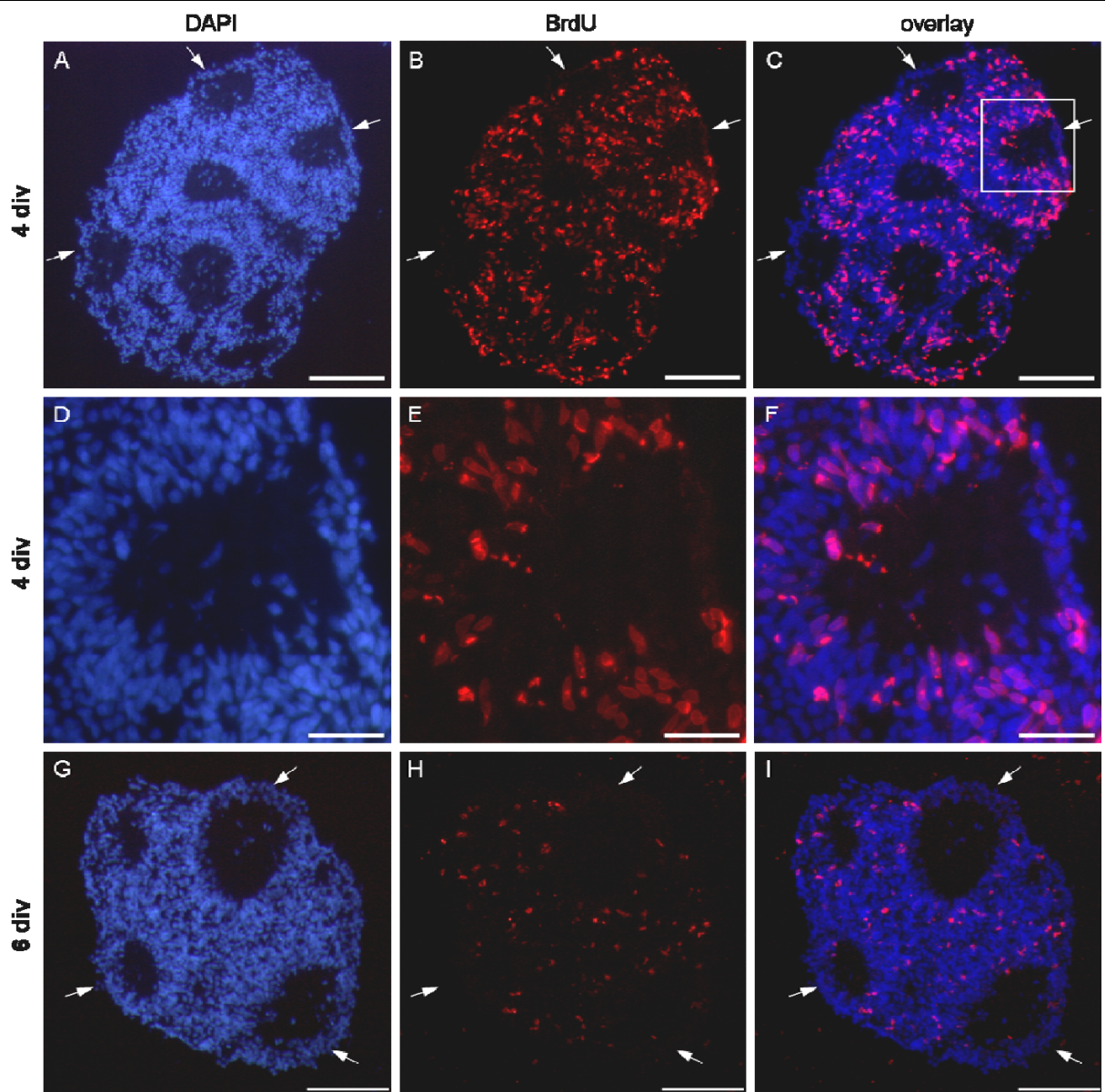
#### **4.2.4 Die Aufwölbungen von IPL-Bereichen über die Oberfläche der Sphäroide ist keine Folge einer erhöhten Proliferation in diesen Bereichen**

Um nachvollziehen zu können, welche Rolle Proliferation in dem hier beschriebenen Phänomen spielt, wurden BrdU-Studien an Sphäroiden vorgenommen. Dafür wurden 50µM BrdU am dritten und fünften Kulturtag in das Medium zugegeben. Die Sphäroide wurden für 16 weitere Stunden kultiviert, anschließend fixiert und die Schnitte mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt. In Abb. 33 ist das Ergebnis dieser Färbungen zu sehen: während des dritten Tages in Kultur ist das BrdU-Signal in fast allen Bereichen des Sphäroids sichtbar. Die Ausnahmen bilden die kernfreien IPL-Bereiche und – im Falle einer an die Sphäroidoberfläche angrenzende IPL - die sie begrenzenden INL-artigen Bereiche. Dort, wo der INL-artige Bereich die Sphäroid-Oberfläche bildet (siehe Pfeile in Abb. 33 A), sind weit weniger Zellen BrdU-positiv als dort, wo er in das Zentrum des Sphäroids hineinreicht. Die Teilungsrate ist an diesen Stellen offensichtlich herabgesetzt. Für andere Oberflächenbereiche, die nicht unmittelbar an eine solche IPL grenzen, gilt dies dagegen nicht. Dort sind die Zellkerne deutlich häufiger BrdU-positiv. Liegt ein IPL-Bereich dagegen vollständig im Inneren des Sphäroids und grenzt nirgendwo an dessen Oberfläche, gibt es keine solchen ungleichmäßigen Verteilungen. Hier sind die BrdU-Signale in den dazugehörigen INL-artigen Bereichen gleichmäßig verteilt.

Der BrdU-Nachweise in fünf Tage alten Sphäroiden zeigt, dass im Vergleich zum dritten Tag deutlich weniger Zellen positiv für BrdU sind. Es ist jedoch weiterhin das, bereits für den dritten Tag, beschriebene Ungleichgewicht in der Proliferation zu erkennen. Dort, wo sich die INL-artigen Bereiche inzwischen deutlich über die restliche Sphäroid-Oberfläche hervorwölben, sind weiterhin weniger Zellkerne positiv für das BrdU-Signal, als dort wo sie dem Zentrum zugewandt sind.

Die hier präsentierten Daten zeigen also, dass die Aufwölbung von IPL-Bereichen über die Sphäroidoberfläche sich nicht auf eine gesteigerte Proliferation der Zellen in den, an der Oberfläche der Sphäroide liegenden, INL-artigen Bereichen zurückführen lässt.





**Abbildung 33: Die Proliferationsrate von Zellen der INL-artigen Bereiche ist abhängig von deren Lage im Sphäroid.** **A-B:** Für den Nachweis von eingebautem BrdU in Rosettensphäroiden wurden neben Kernfärbungen mit DAPI (A) immunhistochemische Färbungen gegen BrdU (B) an Gefrierschnitten von 4 Tage alten Sphäroiden durchgeführt, die vor dem Fixieren für 16 Stunden mit 50µM BrdU inkubiert wurden. **C:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A und B. **D-E:** Detailansicht eines mit DAPI (D) und gegen BrdU (E) gefärbten IPL-Bereichs aus einem 4 Tage alten Sphäroid. **F:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus D und E. **G-H:** Für den Nachweis von eingebautem BrdU in Rosettensphäroiden wurden neben Kernfärbungen mit DAPI (G) immunhistochemische Färbungen gegen BrdU (H) an Gefrierschnitten von 6 Tage alten Sphäroiden durchgeführt, die vor der Fixierung für 16h mit 50µM BrdU inkubiert wurden. **I:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus D und E. Die Färbungen zeigen, dass die Zellen die gleichzeitig die Oberfläche des Sphäroids und die IPL-Bereiche begrenzen, früh aus dem Zellzyklus austreten. Balken in A-C und G-I = 100µm; in D-F = 25µm

#### **4.2.5 Innerhalb der sich bildenden IPL-Bereiche von Rosetten-sphäroiden finden sich große Mengen der Intermediärfilamente Vimentin und Transitin**

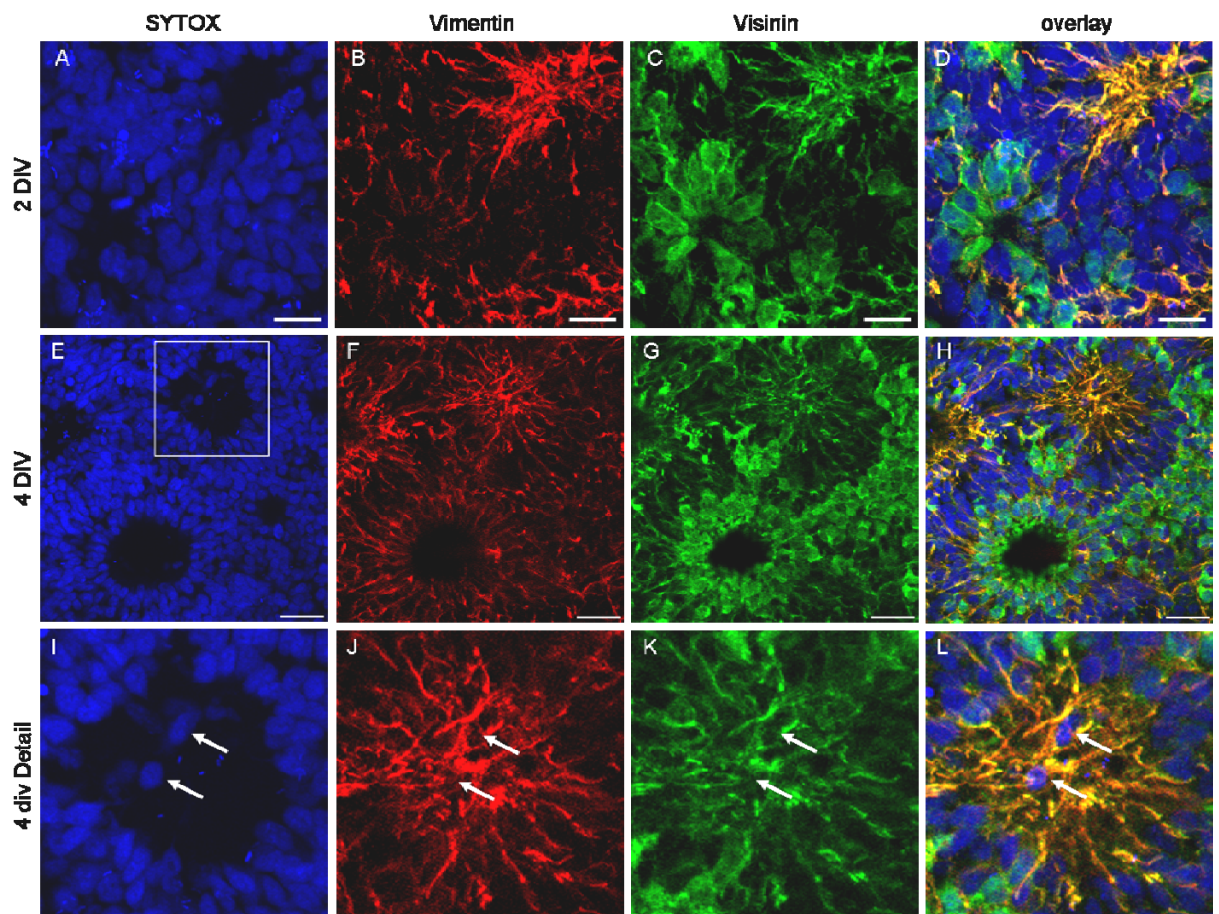
Um genauere Informationen über die Gründe für die hier geschilderten Verschiebungen der IPL-Bereiche in den Sphäroiden zu bekommen, wurde nun deren Entwicklung anhand von Antikörperfärbungen gegen Vimentin und Transitin analysiert. Vimentin ist ein Protein, welches bis zum E8-Stadium über die gesamte Retina verteilt ist, und sich ab dem E10-Stadium auf die Müllerzellen beschränkt (Lemmon and Rieser 1983). Transitin dagegen ist ein, dem Nestin von Säugetieren homologes, Protein, welches zunächst in retinalen Vorläuferzellen exprimiert wird und dessen Expression sich später auf differenzierende Müllerzellen beschränkt (Fischer and Omar 2005).

In zwei Tage alten Sphäroiden zeigen sich innerhalb der Sphäroide bereits kernfreie Bereiche. Sie sind zu diesem Zeitpunkt anhand von Kernfärbungen alleine jedoch noch nicht eindeutig als IPL-Bereiche bzw. als Rosetten identifizierbar. Dafür bedarf es einer, wie in Abb. 34 gezeigten, Doppelfärbung der Schnitte gegen Vimentin und Visinin. Da die für diese Färbungen verwandten Antikörper beide monoklonal sind, erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern, sowie deren Detektion anhand des Zweitantikörpers nacheinander. Die Abb. 34 zeigt in der Kernfärbung zwei kernfreie Bereiche. Der eine lässt sich anhand der Visinin-Färbung eindeutig als Photorezeptor-Rosette identifizieren, in der die Visinin-positiven Zellen ihre dafür typische Anordnung zeigen. Die Färbung gegen Vimentin zeigt in diesem Bereich einige gefärbte Fortsätze, die zwischen den Zellkörpern der Photorezeptoren hindurch in den kernfreien Bereich hinein ziehen. Das Signal ist in diesem Bereich jedoch nur schwach ausgeprägt. Der zweite Bereich ist dagegen frei von Visinin-Signalen und gleichzeitig vollständig von Vimentin-Signalen durchsetzt. Die Zellkörper dieser Vimentin-positiven Zellfortsätze sind nicht ohne weiteres zu identifizieren, da sie offenbar weit von den IPL-Bereichen entfernt liegen.

Zwei Tage später sind Rosetten und IPL-Bereiche bereits nur anhand von Kernfärbungen identifizierbar: Rosetten zeigen nun eine sich absetzende OPL, während sich am Rand der IPL-Bereiche INL-artige Begrenzungen ausbilden. In den Rosetten sind weiterhin die Vimentin-positiven Fortsätze zu sehen. Ihre Signalintensität hat gegenüber dem zweiten Kulturtag jedoch zugenommen hat. In den IPL-Bereichen hat sich das Färbemuster ebenfalls leicht verändert. Die gefärbten Fortsätze, die weiterhin von nicht sichtbaren Zellkörpern in den plexiformen Bereich hineinziehen, erscheinen im Vergleich zum zweiten Kulturtag filigraner. Zu-



sätzlich zu diesen Fortsätzen lassen sich außerdem noch einige Zellkörper an den Grenzen und auch innerhalb der IPL-Bereiche erkennen, die ebenfalls Vimentin exprimieren (siehe Pfeile in Abb. 34 I-L).

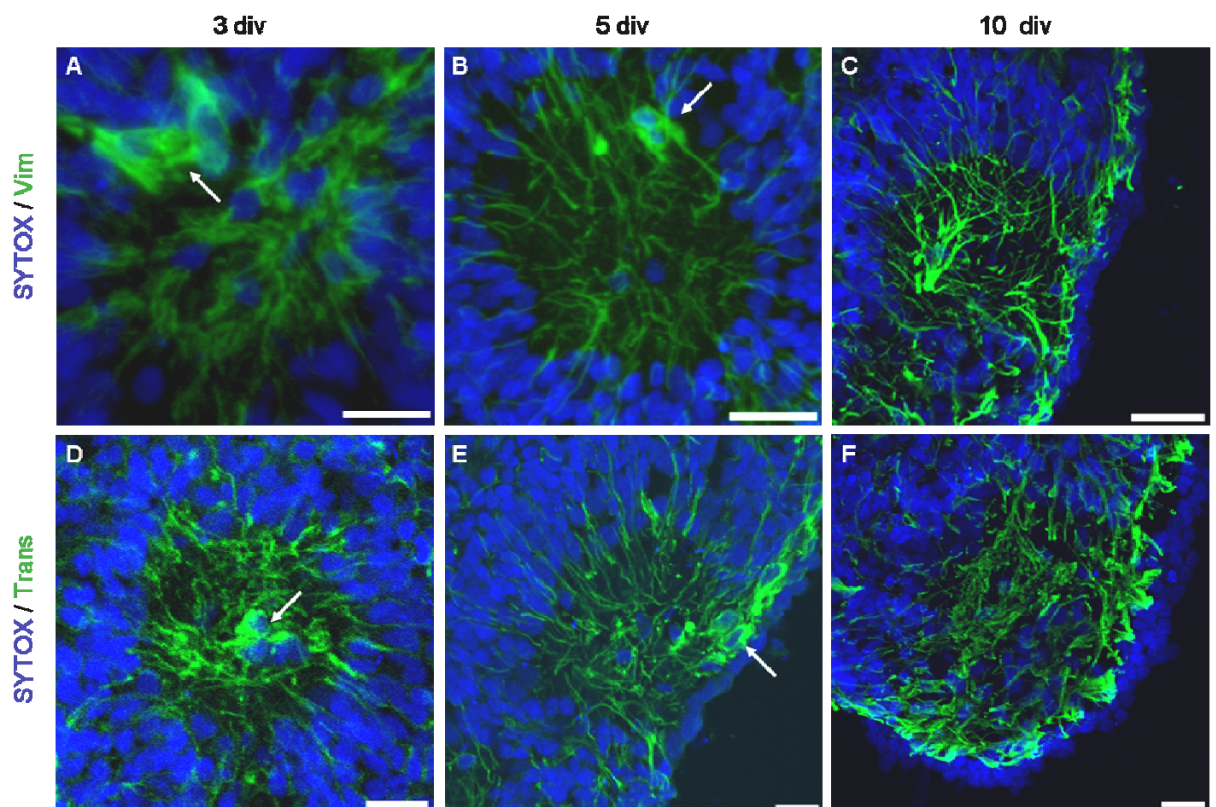


**Abbildung 34: Frühe IPL-Bereiche zeigen eine Anhäufung Vimentin-positiver Fortsätze in ihrem Inneren.** **A-C:** Für den gleichzeitigen Nachweis von Visinin und Vimentin wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange (A) immunhistochemische Färbungen gegen Vimentin (B) und Visinin (C) an Gefrierschnitten von 2 Tage alten Sphäroiden durchgeführt. **D:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A, B und C. **E-G:** Für den gleichzeitigen Nachweis von Visinin und Vimentin wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange (E) immunhistochemische Färbungen gegen Vimentin (F) und Visinin (G) an Gefrierschnitten von 4 Tage alten Sphäroiden durchgeführt. **H:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A, B und C. **I-L:** Detailansicht des in E-H dargestellten IPL-Bereichs. Das Rechteck in E markiert den in I-L vergrößert dargestellten Bereich. Pfeile markieren Zellen mit starker Vimentin-Expression innerhalb der sich entwickelnden IPL-Bereiche. Die Färbungen zeigen, dass anhand einer solchen Doppelfärbung eine eindeutige Unterscheidung zwischen frühen Rosetten und IPL-Bereichen möglich ist. Letztere zeichnen sich durch die Akkumulation großer Mengen an Vimentin-positiven Fortsätzen in ihrem Inneren aus. Balken in A-D = 10µm, in E-L = 20µm.

Dieser letztgenannte Zelltyp wurde mittels Vimentin- und Transitin-Färbungen an drei, fünf und zehn Tage alten Sphäroiden weitergehend untersucht. Wie aus Abb. 35 hervorgeht, lassen sich diese Zellen bereits ab dem dritten Tag *in vitro* innerhalb, und an den Rändern der sich

entwickelnden IPL-Bereiche beobachten. Betrachtet man sich am fünften Kulturtag die in der Peripherie der Sphäroide angesiedelten IPL-Bereiche, so wird deutlich, dass sich einige der Vimentin- und Transitin-positiven Zellen sich inzwischen direkt unter der Oberfläche der Sphäroide bzw. unterhalb der Zellen, welche die IPL-Bereiche gegen das Medium hin abgrenzen, befinden (siehe Pfeil in Abb. 35 E).

Färbungen gegen Glutaminsynthetase zeigen, dass diese Zellen etwa ab dem siebten Kulturtag mit der Expression dieses Müllerzellmarkers beginnen (Ergebnisse nicht gezeigt), wodurch sie als Müllerzellen identifiziert werden können. Ein weiteres auffälliges Merkmal dieser Population von Müllerzellen ist, dass einige der Zellkerne sich horizontal zur Oberfläche ausrichten, wodurch ihre Fortsätze parallel zur Sphäroidoberfläche verlaufen. Vergleicht man die Bilder dieses Stadiums mit denen von zehn Tage alten Sphäroiden, so wird deutlich, dass im weiteren Verlauf der Kultivierung immer mehr solcher Fortsätze auftreten, wodurch sich eine durchgehende Vimentin- bzw. Transitin-Bande direkt unter der Sphäroid-Oberfläche bildet.



**Abbildung 35: Innerhalb der IPL-Bereiche junger Sphäroide finden sich Zellen mit starker Vimentin- und Transitin-Expression.** A-C: Für den Nachweis von Vimentin in Rosettensphäroiden wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange immunhistochemische Färbungen gegen Vimentin an Gefrierschnitten von 3 (A), 5 (B) und 10 Tage (C) alten Sphäroiden durchgeführt und für die Darstellung übereinandergelegt. D-F: Für den Nachweis von Transitin in Rosettensphäroiden wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange immunhistochemische Färbungen gegen Transitin an Gefrierschnitten von 3 (D), 5 (E) und 10 Tage (F) alten Sphäroiden durchgeführt und für die Darstellung übereinandergelegt. Pfeile markieren die, für das jeweilige Protein posi-

ven, Zellkörper. Die Färbungen zeigen die Anwesenheit zahlreicher Vimentin- und Transitin-positiver Fortsätze, sowie die Anwesenheit einiger stark gefärbter Zellen in und um die IPL-Bereiche herum. Abkürzungen: Vim = Vimentin, Trans = Transitin. Balken = 15µm.

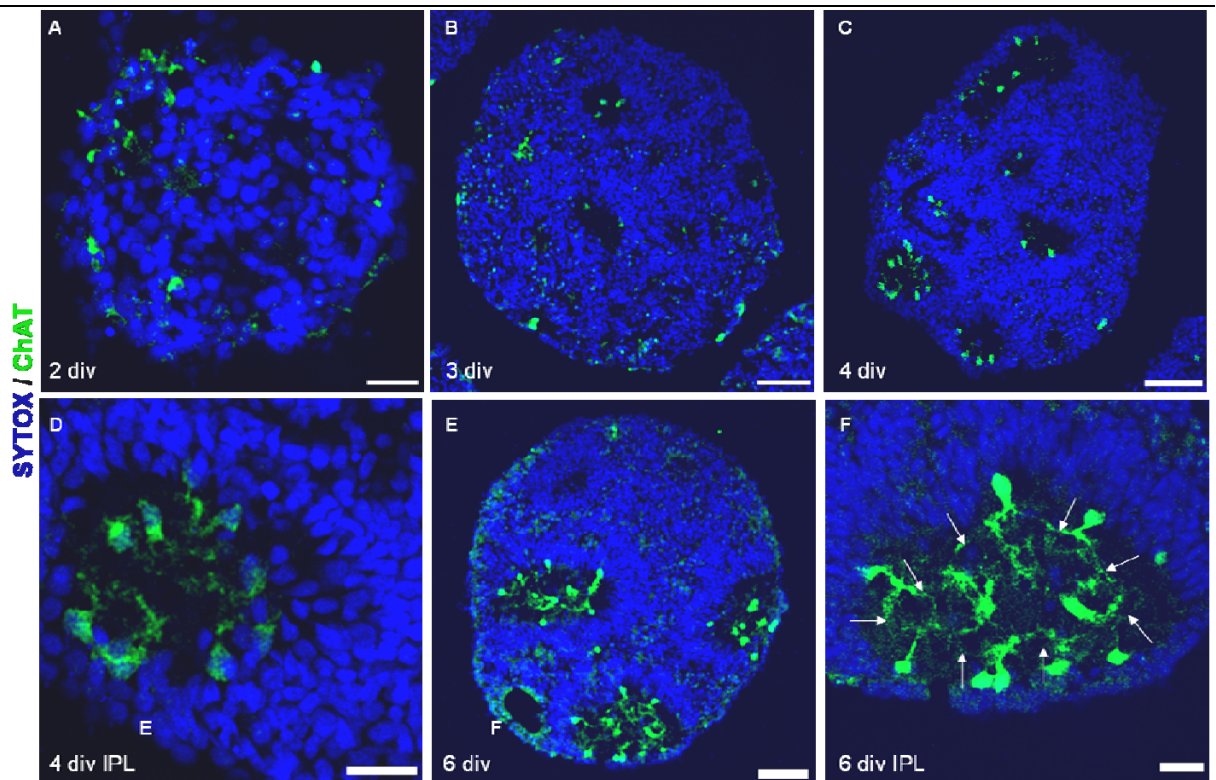
Untersuchungen der Vimentin- und Transitin-exprimierenden Zellen zeigen also deren häufiges Auftreten in unmittelbarer Nähe zu den IPL-Bereichen.

#### **4.2.6 Innerhalb der IPL-Bereiche von Sphäroiden finden sich Zellen des cholinergen Systems**

Bei vielen Vertebraten spielen spontane elektrische Aktivitäten eine wichtige Rolle bei der Strukturierung der IPL (Sernagor and Grzywacz 1996; Wong, Myhr et al. 2000). Ein wichtiger excitatorischer Mediator dieser elektrischen Aktivitäten ist Acetylcholin (ACh), welches von cholinergen Amakrinzellen freigesetzt wird (Zhou 1998; Sernagor, Eglen et al. 2000; Catsicas and Mobbs 2001). In der Hühnerretina tritt diese spontane Aktivität erstmals zwischen E7 und E8 auf (Wong, Sanes et al. 1998; Catsicas and Mobbs 2001). Um die Verteilung cholinergischer Zellen in den Sphäroiden zu untersuchen, die durch die Freisetzung von ACh zur Entstehung spontaner elektrischer Aktivitäten, und damit zur Strukturierung der IPL-Bereiche beitragen könnten, wurden Antikörperfärbungen gegen ChAT durchgeführt.

Wie in Abb. 36 dargestellt, sind bereits nach zwei Tagen in Kultur die ersten ChAT-exprimierenden Zellen in den Sphäroiden zu erkennen. Angesichts der noch nicht vollständig ausgebildeten histotypischen Bereiche in diesem Entwicklungsstadium sind Aussagen über die genaue Anordnung dieser Zellen zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht möglich. Nach drei Tagen *in vitro* sind ChAT-positive Zellen zum einen auf der Oberfläche der Sphäroide, zum anderen bereits innerhalb, sowie an den Rändern der inzwischen deutlich erkennbaren IPL-Bereiche angesiedelt. Ab dem vierten Kulturtag ist nur noch ein geringer Anteil der ChAT-exprimierenden Zellen in den unorganisierten Bereichen der Sphäroide lokalisiert. Die Mehrheit der Zellen ist innerhalb der IPL-Bereiche, sowie den sie begrenzenden INL-artigen Bereichen zu finden. Diese Verteilung bleibt bis zum zehnten Tag in Kultur erhalten, wobei die Anzahl der cholinergen Zellen, die in und um die IPL-Bereiche herum identifiziert werden können, ab dem sechsten Kulturtag geringer wird. Detailaufnahmen der IPL-Bereiche zeigen, dass die gefärbten Zellen vom vierten auf den sechsten Tag Fortsätze ausbilden, die sich in manchen Fällen miteinander verbinden, wodurch es zur Ausbildung von Sublaminae kommt.

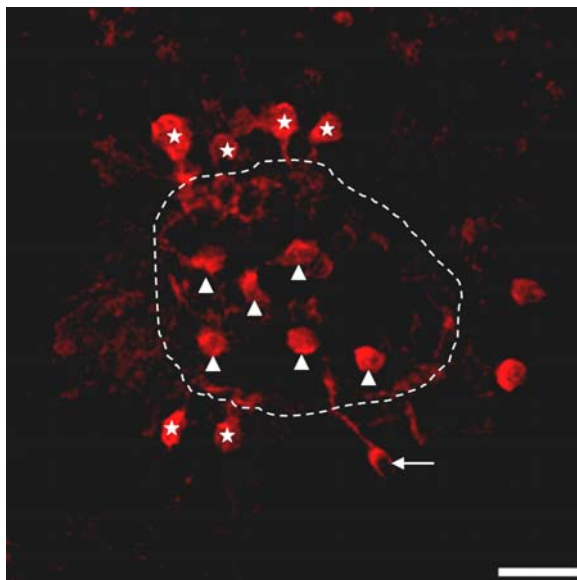




**Abbildung 36: ChAT-exprimierende Zellen konzentrieren sich innerhalb der IPL- sowie den INL-artigen Bereichen. A-F:** Für den Nachweis von ChAT in Rosettensphäroiden wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange immunhistochemische Färbungen gegen ChAT an Gefrierschnitten von 2 (A), 3 (B), 4 (C,D) und 6 Tage alten (E, F) Sphäroiden durchgeführt und für die Darstellung übereinandergelegt. Die IPL-Bereiche der 4 (D) und 6 (F) Tage alten Sphäroide wurden zusätzlich als Detailansicht dargestellt. Pfeile markieren die Fortsätze der gefärbten Zellen. Die Färbungen zeigen, dass ChAT-positive Zellen in Sphäroiden vornehmlich in und um die IPL-Bereiche herum lokalisiert sind und dort zum Teil lange Fortsätze ausbilden. Balken = 50µm in A, D, C, F und 15µm in D, F.

Es ist auffällig, dass sich die Fortsätze dieser Zellen zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Zusammen mit dem Kriterium der Lage des Zellkörpers, ermöglicht dieses zweite Kriterium der Fortsatzbildung eine Unterteilung der ChAT-positiven Zellen in insgesamt drei Typen. Alle diese drei Typen sind in Abb. 37 zu sehen. Beim ersten handelt es sich um Zellen, die innerhalb der INL lokalisiert sind und die lediglich einen kurzen Fortsatz besitzen. Dieser Fortsatz spaltet sich unmittelbar nach dem Eintritt in die IPL auf. Durch die Verbindung mehrerer Fortsätze dieser Zellen kommt es zur Ausbildung einer direkt an den INL-artigen Bereichen gelegenen Subbande. Ein weiterer Typ liegt ebenfalls in den INL-artigen Bereichen und sendet von dort aus einen lang gezogenen Fortsatz bis tief in die IPL hinein. Bei der dritten Art handelt es sich um die innerhalb der IPL-Bereiche lokalisierten Zellen, die ebenfalls nur kleine, sich schnell aufspaltende Fortsätze besitzen, die untereinander ebenfalls eine Subbande ausbilden.

Mit zunehmendem Alter der Sphäroide nimmt die Anzahl der ChAT-positiven Zellen, sowie der von ihnen gebildeten Subbanden in den Sphäroiden immer weiter ab. Diese Abnahme geht mit dem, ab dem sechsten Kulturtag einsetzenden, Rückzug der IPL-Bereiche in das Innere der Sphäroide einher (vgl. Gliederungspunkt 4.2.3).



**Abbildung 37: In den IPL- und INL-artigen Bereichen von Rosettensphäroiden lassen sich drei unterschiedliche Typen von ChAT-exprimierenden Zellen nachweisen.** Für den Nachweis von ChAT in Rosettensphäroiden wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange immunhistochemische Färbungen gegen ChAT an Gefrierschnitten von 6 Tage alten Sphäroiden durchgeführt. Die gestrichelte Linie markiert die mit Hilfe der SYTOX-Färbung ermittelte Grenze zwischen IPL- und INL-artigem Bereich. Pfeilköpfe markieren die innerhalb der IPL-Bereiche lokalisierten Zellen. Sterne markieren die innerhalb der INL-artigen Bereiche lokalisierten Zellen mit kurzen Fortsätzen. Pfeile markieren die ebenfalls dort liegenden Zellen mit langen Fortsätzen. Die Färbung zeigt, dass sich insgesamt drei verschiedene Typen von ChAT-exprimierenden Zellen in und um die IPL-Bereiche herum nachweisen lassen, die sich anhand der Lage ihres Zellkörpers und der Länge ihrer Fortsätze unterscheiden. Balken = 15µm.

Zur weiteren Charakterisierung dieser cholinergen Zellpopulation wurden Doppelfärbungen gegen ChAT und Acetylcholinesterase durchgeführt. Wie in Abb. 38 zu sehen ist, zeigen Antikörperfärbungen mit dem 3D10-Antikörper an sechs Tage alten Sphäroiden deutliche AChE-Signale in und um die IPL-Bereiche herum. Unorganisierte Bereiche sowie Rosetten sind dagegen weitgehend ungefärbt. Detailaufnahmen der IPL-Bereiche zeigen, dass hier einige Zellen sowohl positiv für AChE, als auch positiv für ChAT sind (siehe Pfeilköpfe in Abb. 38). Andere Zellen dagegen exprimieren lediglich eines der beiden Proteine, wobei die Zahl der AChE-positiven Zellen die der ChAT-positiven übertrifft.